

R E M A R K S

Claim 1 was amended to clarify that in the affinity trap reactor, each of the enzyme and the molecule that specifically binds with a substrate of the enzyme are bound to a support (i.e., the enzyme and the molecule that specifically binds with a substrate of the enzyme are both immobilized to the support). Claim 4 was amended in a similar manner, i.e., in the affinity trap reactor, bacillolysin MA and lysine are each bound to a support. Such amendments are supported in the specification on page 3, lines 12 to 14 and page 7, line 22 to page 8, line 15.

Claim 4 was further amended by specifying a reaction between the bacillolysin MA and the plasminogen (see page 2, lines 14 to 15 of the specification). Claim 4 was still further amended by adding a step for eluting the BL-angiotatin formed by an enzyme reaction and obtaining the BL-antiostatin. This amendment is supported in the specification on page 10, lines 27 to 28 and by Example 3 on pages 14 to 15.

New claim 5 is supported by page 4, lines 28 to 29 of the specification.

New claim 6 is supported by the paragraph bridging pages 5 to 6 of the specification.

New claims 7 to 13 are supported by Table 1 on page 5 of the specification and Table 2 on page 7 of the specification.

New claim 14 is supported in the specification on page 3, last line and page 11, lines 11 to 12.

Regarding the first paragraph on page 2 of the Office Action concerning the Information Disclosure Statement filed June 29, 2005, submitted herewith are copies of SHIMIZU et al., Journal of Biochemistry, Vol. 74, No. 8, (2002) and HASUMI, Mishima Kaiun Memorandum Foundation, Research Report, No. 39, (2001), along with English-language abstracts thereof. The Examiner is therefore respectfully requested to return a copy of the Form PTO/SB/08B dated June 29, 2005, with the Examiner's initials next to each of the Shimizu et al. publication and the Hasumi publication.

The following was stated in the second paragraph on page 2 of the Office Action:

"JP 2002-272453 A has been considered to the extent of the provided English Language Abstract."

The position taken by the Examiner as recited in the preceding paragraph neglects that JP 2002-272453 was discussed on page 1 of the specification and was identified in the English-language International Search Report filed June 29, 2005.

The undersigned had a telephone interview with Examiner Kosar on July 17, 2007.

During the aforesaid telephone interview with Examiner Kosar, the Examiner said that if the 35 USC 112, second paragraph rejection as set forth beginning on page 3 and continuing to page 4, line 2 of the Office Action is overcome by claim amendments, the 35 USC 101 rejection set forth on pages 2 to 3 of the Office Action may also be overcome.

During the aforesaid telephone interview with the Examiner, the Examiner suggested that claim 1 may be amended to set forth the structural relationship among (a) the support, (b) the enzyme and (c) the molecule that specifically binds with a substrate of the enzyme.

During the aforesaid telephone interview with the Examiner, the Examiner said that a step is missing in claim 4 after the

reacting step. The Examiner considered that an isolating step or a production step should be set forth in claim 4.

Claims 1 and 2 were rejected under 35 USC 101 for allegedly being directed to non-statutory subject matter for the reasons set forth on pages 1 and 2 of the Office Action. The Examiner's reasons for the rejection refer to page 258 of Östman, Trends in Cell Biology, (2001), 11(6), 258-266.

The position was taken in the Office Action that claims 1 and 2 read upon naturally occurring compositions.

In the affinity trap reactor of applicants' present claims, it is recited that both an enzyme and a molecule that specifically binds with a substrate of the enzyme are each bound to a support, and the enzyme and the molecule that specifically binds with a substrate of the enzyme are both immobilized to the support. This also applies to applicants' present claim 4. By amending claims 1 and 4 as set forth above, it is respectfully submitted that it is clear how the components of the affinity trap reactor are interconnected to each other.

Withdrawal of the 35 USC 101 rejection is thus respectfully requested.

Claims 1 to 4 were rejected under 35 USC 112, second paragraph, for the reasons set forth on pages 3 to 4 of the Office Action.

It is respectfully submitted that the above claim amendments avoid the 35 US C112, second paragraph rejection.

Withdrawal of the 35 USC 112, second paragraph rejection is respectfully solicited.

Claims 1 and 2 were rejected under 35 USC 102 as being anticipated by Östman, Trends in Cell Biology, (2002), 11(6), 258-266, McClung et al., Journal of Biomedical Materials Research, (2000), 4993), 409-414, Patel et al. (USP 5,227,297), Fischer et al. (USP 6,228,613) or Römisch et al. (USP 6,528,299) for the reasons set forth on pages 4 and 5 of the Office Action.

In the affinity trap reactor of applicants' claims 1 and 2 comprising a support, an enzyme and a molecule that specifically binds with a substrate of said enzyme, both the enzyme and the molecule that specifically binds with a substrate of the enzyme, are each bound and immobilized to the support. By using the affinity trap reactor of the present claims, a reaction between an enzyme bound to the support, such as a protease, and a

substrate, can proceed efficiently and rapidly without being affected by spatial restrictions (see page 2, lines 2 to 34 of the present specification).

It is stated in the Office Action that Östman describes a membrane-bound protein (receptor tyrosin kinase ("RTK")), which has a support (cell membrane) bound to RTK, and a molecule (protein tyrosin phosphatase ("PTP")) that binds the substrate of RTK (tyrosine). However, this is a naturally occurring complex on a cell surface. On the other hand, the affinity trap reactor of applicants' present claims is an artificially prepared enzyme-immobilized reactor prepared by selecting a necessary combination of a support, an enzyme and a molecule that specifically binds with a substrate of the enzyme. Further, Östman does not teach or suggest an affinity trap reactor. Thus, it is respectfully submitted that the affinity trap reactor of applicants' claims is quite different from the naturally occurring complex of Östman. Thus, applicants' present claims are not anticipated by Östman.

It was stated in the Office Action that McClung et al. anticipate applicants' claims. McClung et al. disclose a blood-contacting surface consisting of a polyurethane to which a

coating reagent (polyacrylamide with lysine and benzophenone moieties) is attached, and the surface specifically binds to plasminogen via the lysine moieties (see the Abstract of McClung et al.). Further, it is also suggested that tissue-type plasminogen activator ("t-PA"), an enzyme, binds to the surface lysine moieties via the lysine binding site of kringle 2 of plasminogen (see the Conclusions of McClung et al.). Thus, it is definite that t-PA does not directly bind to the surface, but binds to the lysine moieties. Accordingly, the affinity trap reactor of applicants' present claims is substantially different from the surface of McClung et al. in that in applicants' present claims, both an enzyme and a molecule that specifically binds with a substrate of the enzyme are each bound with the support. Thus, applicants' present claims are not anticipated by McClung et al.

It was stated in the Office Action that Patel et al. teach a protease, a support and molecule that binds with the substrate, and the enzyme's substrate (-X-Y-Arg). However, Patel et al. teach merely a solid support for purifying a plasminogen activating enzyme (PA), the support having a tripeptide ligand -X-Y-Arg with a high affinity for the enzyme PA.

The support of Patel et al. is quite different from the affinity trap reactor of applicants' present claims in that the support of Patel et al. does not have both an enzyme and a molecule that specifically binds with a substrate of the enzyme directly binding thereto. Further, the enzyme which binds to the support of the affinity trap reactor of applicants' present claims acts on a substrate, whereas the support of Patel et al. is used merely to purify the enzyme PA, and does not act on the enzyme's substrate. The affinity trap reactor of applicants' present claims is thus substantially different from the Patel et al. support. Thus, applicants' present claims are not anticipated by Patel et al.

It was stated in the Office Action that Römisch et al. teach a chromatographic system that employs a substrate that immobilizes heparin/heparin-related compounds, and these compounds also bind to protease and/or its proenzyme, giving the compounds a dual status as both a linker and an enzyme substrate. However, Römisch et al. teach merely an affinity chromatography in which heparin is immobilized on a matrix, preferably by using a spacer, lysine, and this is used for selectively binding and

then eluting a protease for activating the blood clotting factor VII.

The affinity chromatography in Römisch et al. is quite different from the affinity trap reactor of applicants' present claims in that the chromatography in Römisch et al. does not have both an enzyme and a molecule that specifically binds with a substrate of the enzyme directly binding to the matrix, as the component of such a chromatographic system. Further, the enzyme which binds to the support of the affinity trap reactor of applicants' present claims acts on a substrate, whereas the affinity chromatography in Römisch et al. is used merely to selectively bind and elute a protease, and does not act on the enzyme's substrate. The affinity trap reactor of applicants' present claims is therefore substantially different from the affinity chromatography in Römisch et al. Accordingly, applicants' present claims are not anticipated by Römisch et al.

It was stated in the Office Action that Fischer et al. describe a chromatographic system that uses a heparin affinity chromatography to selectively bind to plasma protease. However, Fischer et al. teach merely a heparin affinity chromatography for

collecting stable factor VII/vWF-complex, and it is set forth in Example 7 of Fischer et al. that a plasma protease was selectively removed by using lysine Sepharose chromatography.

The heparin affinity chromatography of Fischer et al. is quite different from the affinity trap reactor of applicants' present claims in that the heparin chromatography of Fischer et al. do not have both an enzyme and a molecule that specifically binds with a substrate of the enzyme directly binding to the sepharose as the component of such a chromatography system. Further, the enzyme which binds to the support of the affinity trap reactor of applicants' present claims acts on a substrate, whereas the heparin affinity chromatography of Fischer et al. is used merely to selectively collect a plasma protease, and does not act on the protease's substrate. The affinity trap reactor of applicants' present claims is therefore substantially different from the heparin affinity chromatography of Fischer et al. Thus, applicants' present claims are not anticipated by Fischer et al.

It is therefore respectfully submitted that applicants' claims 1 and 2 are not anticipated by the references. Withdrawal

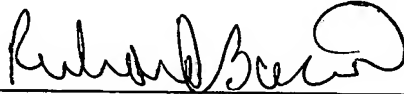
of the 35 USC 102 rejection is therefore respectfully requested.

Reconsideration is requested. Allowance is solicited.

An INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT is being filed
concomitantly herewith.

If the Examiner has any comments, questions, objections or
recommendations, the Examiner is invited to telephone the
undersigned at the telephone number given below for prompt
action.

Respectfully submitted,



RICHARD S. BARTH

REG. NO. 28,180

FRISHAUF, HOLTZ, GOODMAN & CHICK, P.C.
220 FIFTH AVENUE, 16th FLOOR
NEW YORK, NEW YORK 10001-7708
Tel. Nos. (212) 319-4900
(212) 319-4551/Ext. 219
Fax No. (212) 319-5101
E-Mail Address: BARTH@FHGC-LAW.COM
RSB/ddf

- Encs.: (1) PETITION FOR EXTENSION OF TIME
- (2) copies of SHIMIZU et al., Journal of Biochemistry,
Vol. 74, No. 8 (2002) and HASUMI, Mishima Kaiun
Memorandum Foundation Research Report, No. 39 (2001),
along with English-language Abstracts thereof
- (3) INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT

4P-459

One step purification of angiostatin from plasma using a new processing protease bacillolysin MA

Kosuke Shimizu¹, Ritsuko Narasaki¹, Harushige Kuribayashi¹,
Tsutomu Sato², Keiji Hasumi¹

(¹:Applied Biological Science, Tokyo University of
Agricultural and Technology; ²:School of Agricultural
Science, Tokyo University of Agricultural and Technology)

[Purpose]

Angiostatin, a specifically decomposed fragment of plasminogen (Lys⁷⁸-Val⁴⁴²) inhibits angiogenesis and induces inhibition of tumor growth and degeneration of tumor. In the recent research, we found a new microbiological protease which forms an angiostatin-like fragment from plasminogen. The object of the present study is to evaluate the property of this enzyme and the activity of the resulting angiostatin-like fragment, and establish one step process of angiostatin conversion and purification from plasma using this enzyme.

[Method and Result]

A new processing enzyme, bacillolysin MA (BLMA) in an amount of 90 mg was purified from 3 liter of cultural medium of *Bacillus megaterium* A9542 strain by one step using CM cellulose, and it was found based on the genome base sequence that it belongs to a kind of neutral metalloprotease, bacillolysin family. BLMA formed an angiostatin-like fragment (Glu¹-Ser⁴⁴¹; BL-AS) by cleaving Ser⁴⁴¹-Val⁴⁴² of plasminogen at K_m 18.1 μ M, k_{cat} 4.67 sec⁻¹. Similarly to angiostatin, BL-AS inhibited the proliferation, migration and lumen formation of vascular endothelial cells at 3-10 μ g/ml. Further, we developed a carrier on which both BLMA and lysine are fixed, and established an efficient purification method of BL-AS in which the plasminogen purification and angiostatin conversion from plasma are carried out by one step process.

昭和29年3月25日 国鉄特別扱承認雑誌 第2762号 昭和30年7月18日 第3種郵便物認可
第74巻 第8号 平成14年8月25日発行 (毎月1回25日発行)
SEIKAQ74(8) 599-1134(2002) ISSN 0037-1017

生化学

Vol.74 No.8 2002

EMMEN

第75回 日本生化学会大会発表抄録集

特別講演 599

パースペクティブレクチャー 603

モーニングレクチャー (出版社共催) 607

シンポジウム 616

ポスター 714

Late-breaking ポスター 1096

バイオインダストリーセミナー 1100

本会記事 1116

発表者氏名索引 巻末

サブジェクトインデックス 巻末

日本生化学会

THE JAPANESE BIOCHEMICAL SOCIETY

TEL 03-3815-1913 FAX 03-3815-1934

JSB
The Japanese
Biochemical
Society

4P-454 血液レオロジー装置を用いた血流低下の分子機構の解析

○鎌田 孝彦, 鈴木 宏治
(三重大・医・分子病態)

【目的】近年増加傾向にある肺塞栓症や深部静脈血栓症等の発症は、術後の長期臥床時や運動不足に伴う血流の低下が血栓形成を誘発するためと考えられている。これらの血栓症発症の発症機構の解明には、何よりも血液凝固の活性化と血流低下の関係の分子機構の解明が重要と考えられる。今回我々は、血液凝固の活性化と血流の関係の分子機構を解析し、血流改善薬を開発するための基礎的検討を行った。【方法】血流の測定には全血の流動性を *in vitro* で測定できる血液レオロジー装置 (MC-FAN) を用いた。全血に LPS や ADP などの血液凝固や血小板凝集誘起物質と Ca^{2+} を添加し、血液凝固の活性化に起因する血流の低下を測定した。また、上記の刺激により血流低下が観察された血液凝固の凝固マーカー (TAT 及び F1+2) の変動を ELISA で測定した。さらに、上記の凝集系に種々の抗凝固剤や抗血小板剤 (ヘパリン、ヒルジン、sTM、APC、GPIIb/IIIa 阻害薬等) を添加し、その血流に及ぼす影響と凝固マーカーの変動を解析した。【結果】全血に LPS あるいは ADP を添加することにより、濃度依存性に血流の低下が観察された。また同時に凝固マーカーの TAT 及び F1+2 の上昇が観察された。これらの血流低下及び凝固マーカーの上昇は、各種の抗凝固剤や抗血小板剤の添加により、濃度依存性に抑制された。【結論】全血の血流低下の原因として、血液成分 (単核球、血小板) の活性化に伴う血液凝固の活性化と増幅反応が示唆され、また血流低下の改善には、抗凝固薬や抗血小板剤が有効であることが示唆された。

4P-455 プロテイン C インヒビター (PCI) は、腎癌細胞の uPA 依存性細胞浸潤活性を阻害する

○林 辰弥, 脇田 利明, 西岡 淳二, 鈴木 宏治
(三重大・医・分子病態)

【目的】セリンプロテアーゼインヒビターの PCI は、ヒトでは肝臓、腎臓、生殖腺等などで産生され、血漿中では活性化プロテイン C を阻害し、精液中では前立腺特異抗原 (PSA) を阻害する。尿中 PCI の大部分は uPA との複合体として存在するが、腎における PCI の生理的意義は明らかでない。我々はこれまで、腎癌患者では腎の非癌部に比較して癌部で PCI の発現量が著しく低下していることを報告してきた。そこで本研究では、腎癌細胞の浸潤に及ぼす PCI の影響を検討した。

【方法】PCI 強制発現腎癌細胞は、ヒト PCI cDNA 発現ベクター (pRC/CMV) を導入して作製した。腎癌細胞の浸潤に及ぼす PCI の影響は、マトリゲルを用いた *in vitro* 浸潤活性評価系を用いて解析した。

【結果】正常腎近位尿管上皮細胞では uPA 及び PCI が共に強く発現していた。腎近位尿管上皮細胞由来の株化腎癌細胞 Caki-1 細胞では uPA は発現していたが、PCI の発現はみられなかった。Caki-1 細胞の浸潤活性は、精製 PCI 及び抗 uPA 抗体によって阻害された。また、PCI 発現 Caki-1 細胞の浸潤活性は非発現 Caki-1 細胞に比較して有意に低下した。PCI 発現 Caki-1 細胞の培養上清中の uPA 活性は非発現 Caki-1 細胞に比較して低下しており、uPA-PCI 複合体は PCI 非発現 Caki-1 細胞に比較して有意に増加していた。

【結論】腎癌細胞の浸潤活性は PCI による uPA 活性の阻害により低下したことから、腎癌細胞では PCI の発現低下により、uPA 依存性の細胞浸潤活性が高まることを示唆された。

4P-456 血管内皮プロテイン C レセプター (EPCR) とトロンボモジュリン (TM) の会合

○常吉 直子, 福留 健司, 木本 雅夫
(佐医大・病態予防医学)

【目的】我々は、昨年の生化学会で PC 活性化反応に携わるレセプター分子、血管内皮プロテイン C レセプター (EPCR) とトロンボモジュリン (TM) が、互いに会合していることを明らかにした。今回は、TM のどの部分を介して EPCR と結合しているかを検討した。【方法】TM のアミノ末端の欠失ミュータントと EPCR との共沈の実験結果から、TM の O 型糖鎖結合ドメインもしくは膜貫通領域が EPCR と会合していることが示唆された。そこで、TM のトランスメンブレン領域および細胞内領域を TM とは全く異なる RP105 分子に、また O 型糖鎖結合ドメイン、トランスメンブレン領域および細胞内領域を RP105 に置き換えた二種類のキメラ蛋白で解析を行った。それぞれキメラ TM 単独およびキメラ TM と EPCR を共発現させたトランスフェクタント細胞株を樹立した。それらの細胞株で、抗 EPCR モノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行ったあと、沈降蛋白を TM に付けたタグ抗体でプロットした。【結果】EPCR と O 型糖鎖結合ドメインを含む TM を共発現しているトランスフェクタント細胞株で抗 EPCR 抗体による TM の共沈が検出された。しかし、TM の O 型糖鎖結合ドメインを RP105 で置き換えた場合は共沈が認められなかった。また、EPCR 陰性の細胞株からはどちらも沈降しなかった。【結論】PC の活性化反応に関わる EPCR と TM は互いに会合しており、この会合はこれまでに知られている TM の抗凝固機能に関係のない領域である O 型糖鎖結合ドメインを介していることが明らかになった。

4P-457 ヒトプロトロンビン変異体による活性制御と機能相関

○小池 恒, 奥田 大樹, 森田 隆司
(明治大・生体分子学)

血液凝固は、高等生物において非常に重要な生体防御機構の一つである。種々の原因により生じた血液凝固反応は、最終的にトロンビンの活性化に集約され、フィブリノーゲンの限定分解を引き起こし、フィブリン塊が生じる。また、トロンビンは血小板上に存在する PAR-1 を活性化し、血小板の活性化を引き起こして血小板の凝集・粘着を生じさせる。一方でトロンビンは血管内皮に存在するトロンボモジュリンと相互作用することにより、プロテイン C を限定分解し、活性化プロテイン C を生じさせる。活性化プロテイン C は凝固 Va・VIIIa 因子を分解し、不活性化型にして凝固反応を抑制することが知られており、また活性化プロテイン C は線溶作用や抗炎症作用を有することが示唆されている。トロンビンはプロトロンビンが限定分解により活性化されるが、この活性化中間体として A・B 鎖間のみが切断されたメイソトロンビンと呼ばれる分子の存在が確認されている。メイソトロンビンは、フィブリノーゲンとの相互作用が 1/10 程度に低下していること、トロンボモジュリン・リン脂質によりトロンビン以上のプロテイン C 活性化能を持つことが知られている。また、トロンビンは生理的条件下では分子内に Na^+ を保持しているが、 Na^+ 除去により、フィブリノーゲン切断活性が著しく低下することが知られている。

今回、我々はヒトプロトロンビン遺伝子にアミノ酸置換を導入することにより、フラグメント 1、2、A 鎖での切断を受けない安定なメイソトロンビン変異体を作製した。さらに B 鎖に存在する Na^+ 結合部位に変異を導入することで、トロンビンとしての酵素活性は維持しつつ、フィブリノーゲン切断活性を特異的に低下させ、プロテイン C 活性化能を亢進している変異プロトロンビンを作製し、その発現に成功した。

4P-458 血小板膜糖蛋白質 glycoprotein Iba の機能ドメインの発現

○林 亜紀, 小池 恒, 奥田 大樹, 森田 隆司
(明治大・生体分子学)

【背景】血小板は血栓形成及び止血において重要な役割を担っている。血管が損傷すると基底膜のコラーゲンが露出し、血漿蛋白 von Willebrand factor (vWF) がコラーゲンに結合することにより活性化される。活性化型 vWF に血小板膜糖蛋白質 glycoprotein Ib (GP Ib) が結合することで血小板の粘着・活性化が起こる。GP Ib は分子量 135kDa の α 鎖と 25kDa の β 鎖からなり、特に α 鎖の N 末端側 45kDa の領域 (290 アミノ酸残基) は vWF との結合に重要である。その構造は、まず Leu が多く含まれる leucine-rich repeat (LRR) と呼ばれる約 24 アミノ酸残基の繰り返し 7 回続き、次に 2 組のジスルフィド結合を持つ loop region、更に酸性アミノ酸、硫酸化 Tyr が集中する anionic sulfated region が続いている。

【目的】GP Ib は vWF との結合に重要な役割を担っており、vWF と結合することが知られている flavocetin-A (FL-A) と GP Iba の結合領域を決定するため、FL-A と GP Iba の発現を行った。

【結果】大腸菌を用いた組換え GP Iba は FL-A との結合が見られたことから、GP Iba 上の糖鎖付加及び硫酸化 Tyr は GP Iba と FL-A の結合には影響しないことが示唆された。また、このとき LRR 領域だけでも結合が見られた。この LRR 領域が FL-A との結合に関与することが示唆された。機能動物細胞で GP Iba を発現させ、GP Iba の糖鎖が FL-A との結合にどのように影響するか調べ、また、結合領域を決定するために欠失変異体を作製している。

4P-459 新規プロセシングプロテアーゼ bacillolysins MA を用いたアンジオスタチンの血漿からの 1 段階精製

○清水 幸輔¹, 奈良崎 律子¹, 栗林 孝茂¹, 佐藤 勉², 蓮見 恵司¹
(¹東京農工大・応生,²東京農工大・農学研究科)

【目的】プラスミノゲンの限定分解フラグメントであるアンジオスタチン (Lys¹⁸-Val⁴²) は、血管新生を抑制し、腫瘍の成長阻害および退縮をもたらす。最近の研究で、我々はプラスミノゲンからアンジオスタチン断片を生産する新規微生物プロテアーゼを発見した。本研究は、本酵素の特性および生成するアンジオスタチン断片の活性の評価、ならびに本酵素を用いた血漿からのアンジオスタチン変換・精製の 1 段階プロセスの確立を目的とした。【方法および結果】*Bacillus megaterium* A9542 株の培養液 3 L から CM cellulose による 1 段階ステップで 90 mg の新規プロセシング酵素 bacillolysins MA (BLMA) を精製し、ゲノム塩基配列から中性金属プロテアーゼの 1 種 bacillolysins family に属することを明らかにした。BLMA はプラスミノゲンの Ser⁴¹-Val⁴² 間を K_m 18.1 μ M, k_{cat} 4.67 sec⁻¹ で開裂して、アンジオスタチン断片 (Glu¹-Ser⁴¹; BL-AS) を生成した。BL-AS はアンジオスタチンと同様、3-10 μ g/ml で血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を阻害した。また、BLMA とリジンとともに固定化した担体を開発し、血漿からのプラスミノゲン精製・アンジオスタチン変換を 1 段階のプロセスで行う効率的な BL-AS の精製法を確立した。

1. 背景

アンジオスタチン：プラスミノゲンのクリングル1から4までのフラグメントであり、がん組織において、MMPやプラスミンの作用で生成する。血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を選択的に阻害し、血管新生を抑える。がんの増殖を抑え休眠状態を導く。現在、組換えアンジオスタチンが臨床開発されている。

アンジオスタチン様プラスミノゲン断片：アンジオスタチン(L⁷⁴-L⁴⁵¹)以外にプラスミノゲンのクリングル構造を含むいくつかの断片(Y⁸⁰-N⁴⁴⁰、K⁷⁸-K⁴⁶⁸など)が、同様の抗血管新生阻害作用をもつ。

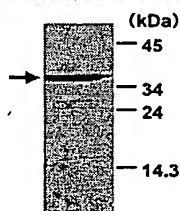
2. 要旨

1. *Bacillus megaterium* (A9542株) から、プラスミノゲンを選択的に切断してアンジオスタチン様断片(B-AS)を生成する新規酵素 bacillolysin MA (BL-MA)を発見した。B-ASはHUVECの増殖・遊走・管腔形成を阻害した。

2. 固定化BL-MAリアクター(アフィニティトラップリアクター)を開発し、それを用いて、1段階プロセスでの血漿からのB-ASの変換・精製に成功した。

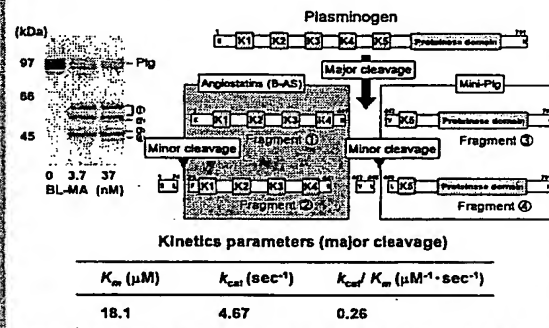
3. Bacillolysin MAの精製

Bacillus megaterium A9542
培養上清 1 L
↓
CM-cellulose クロマトグラフィー
↓
BL-MA 34.1 mg

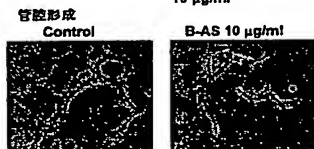
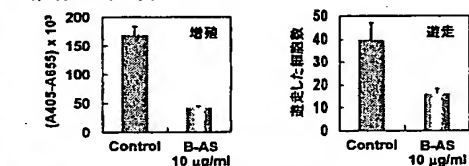


Step	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Culture supernatant	48600	2.5×10^5	5.1	100	1
CM-cellulose	34.1	1.2×10^5	3519	48	685

4. Bacillolysin MAによるプラスミノゲンの開裂

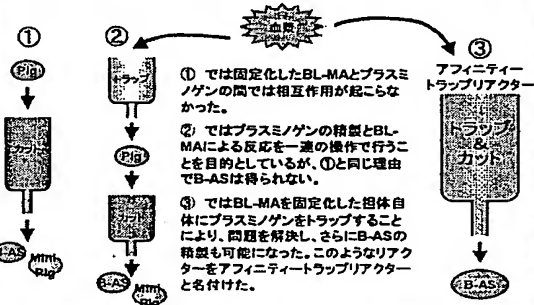


5. B-ASによるHUVECの増殖、遊走および管腔形成の阻害



B-ASはHUVECの増殖、遊走、管腔形成を抑制した。

6. Bacillolysin MAを用いたB-AS生産方法の検討



7. アフィニティトラップリアクター (BL/Lys-Sepharose) の作製

CNBr-activated Sepharose 4B

└ BL-MA

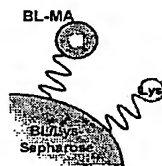
固定化

└ Lysine

余剰な活性基をブロック

|

BL/Lys-Sepharose



8. BL/Lys-Sepharoseを用いた血漿からのB-ASの一段階精製

Human plasma 100 ml

↓
BL/Lys-Sepharose

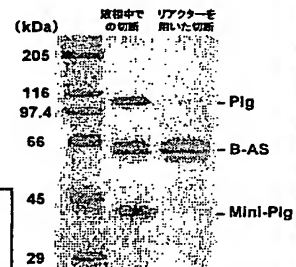
Wash

EACA elution

↓
B-AS 4.2 mg

(全操作を4℃で行った)

N末端配列はプラスミノゲンをBL-MA処理して得られるアンジオスタチン様フラグメントと一致した。

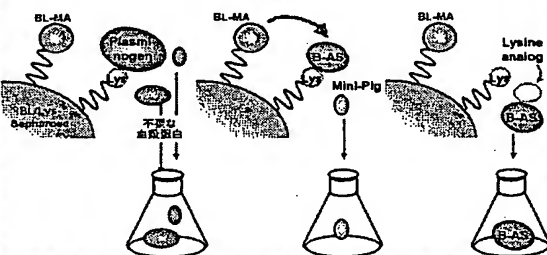


9. 一段階精製の模式図

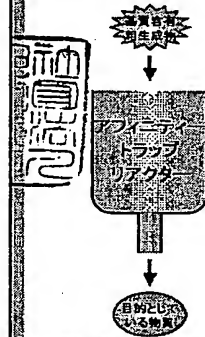
①プラスミノゲンはクリンクル領域を介して、リジンと結合する。

②BL-MAがプラスミノゲンをアンジオスタチン様フラグメント (B-AS) に変換する。

③リジンアナログを用いてB-ASを溶出する。



10. アフィニティトラップリアクターの長所



○リアクターの機能だけでなく、同時に精製が行える。

○非常に効率良く酵素基質反応が起こる。(他の酵素と基質に対しても応用が可能かもしれない。)

本誌へのご寄稿について

下記の欄への会員の皆様からのご寄稿を歓迎いたします。

- 総 説 著者の成果を中心に、その分野の現況を専門外の読者にも理解できるよう平易に、1行25字×22行詰め原稿用紙40枚以内。
- みにれびゅう 最近の新しい発展、問題点を中心にした小解説。文献も重要なものに厳選して。原稿用紙12枚以内（文献15以下）。
- テクニカルノート 新しい技術（特別に新しくはなくてもまだあまり知れわたっていないもの、便利な工夫、新しい応用面が開発されたものなどを含む）の紹介。とくに読んですぐ役に立つよう具体的に、またその応用の限界なども含めて、各研究室自慢の手法を気軽にどうぞ。原稿用紙10～14枚程度。
- こ と ば 新しい言葉、難しい言葉の解説など。420字程度。
- て が み 本誌の記事内容に関する感想・意見・異見や、会員相互に意見交換をはかりたい事がらを気軽に原稿用紙2～3枚程度。
- ひ ろ ば 学会の諸活動、事業に対する会員の意見をとりあげ、相互の理解を深めるためのパネル、原稿用紙6枚以内。

北から南から 所属研究室、学科などの紹介記事を自由なスタイルで原稿用紙6～10枚程度に。

賛助会員のページ 関連企業、研究所などの紹介記事を自由なスタイルで原稿用紙4～8枚程度に。写真も。

▶ 原稿の送り先：〒113-0033 東京都文京区本郷5-25-16 石川ビル3階 日本生化学会「生化学」誌企画委員会
TEL 03-3815-1913 FAX 03-3815-1934

原稿はA4判の用紙に1行25字×22行で印字し、フロッピーを添えてご提出ください。投稿にあたっては投稿規定を上記へ請求し熟読のうえ、ご投稿ください。ただし他誌へ投稿し掲載されたものはご遠慮ください。

複写をされる方に

本誌(書)に掲載された著作物は、政令が指定した図書館で行うコピーサービスや、教育機関で教授者が講義に利用する複写をする場合等、著作権法で認められた例外を除き、著作権者に無断で複写すると違法になります。そこで、本著作物を合法的に複写するには、著作権者から複写に関する権利の受託を受けている次の団体と、複写をする人またはその人が所属する企業・団体等との間で、包括的な許諾契約を結ぶようにして下さい。

学術著作権協会

〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル3F

TEL 03-3475-5618 FAX 03-3475-5619

Notice about photocopying

In order to photocopy any work from this publication, you or your organization must obtain permission from the following organization which has been delegated for copyright for clearance by the copyright owner of this publication.

The Copyright Council of the Academic Societies
6-41 Akasaka 9-chome, Minato-ku,

Tokyo 107-0052, Japan

TEL : 81-3-3475-5618

FAX : 81-3-3475-5619

生 化 学 第74巻 第8号

平成14年8月25日発行 © 2002

定価10,000円(本体9,524円)

(1か年概算25,475円)

編集兼 社団法人 日本生化学会
発行人

発行所：社団法人 日本生化学会

〒113-0033 東京都文京区本郷5-25-16

石川ビル3階

Tel. (03) 3815-1913

製 作：財団法人 学会誌刊行センター

〒113-0032 東京都文京区弥生2-4-16

学会センタービル

印刷所：大昭和印刷株式会社

〒112-0002 東京都文京区小石川2-23-11

常光ビル7階

Mishima Kaiun Memorial Foundation
Research Report
2001 (No. 39)

A new microbiological enzyme which catalyzes angiotensin
conversion of plasminogen

Keiji Hasumi
Assistant Professor, the Faculty of Agriculture, Tokyo
University of Agricultural and Technology

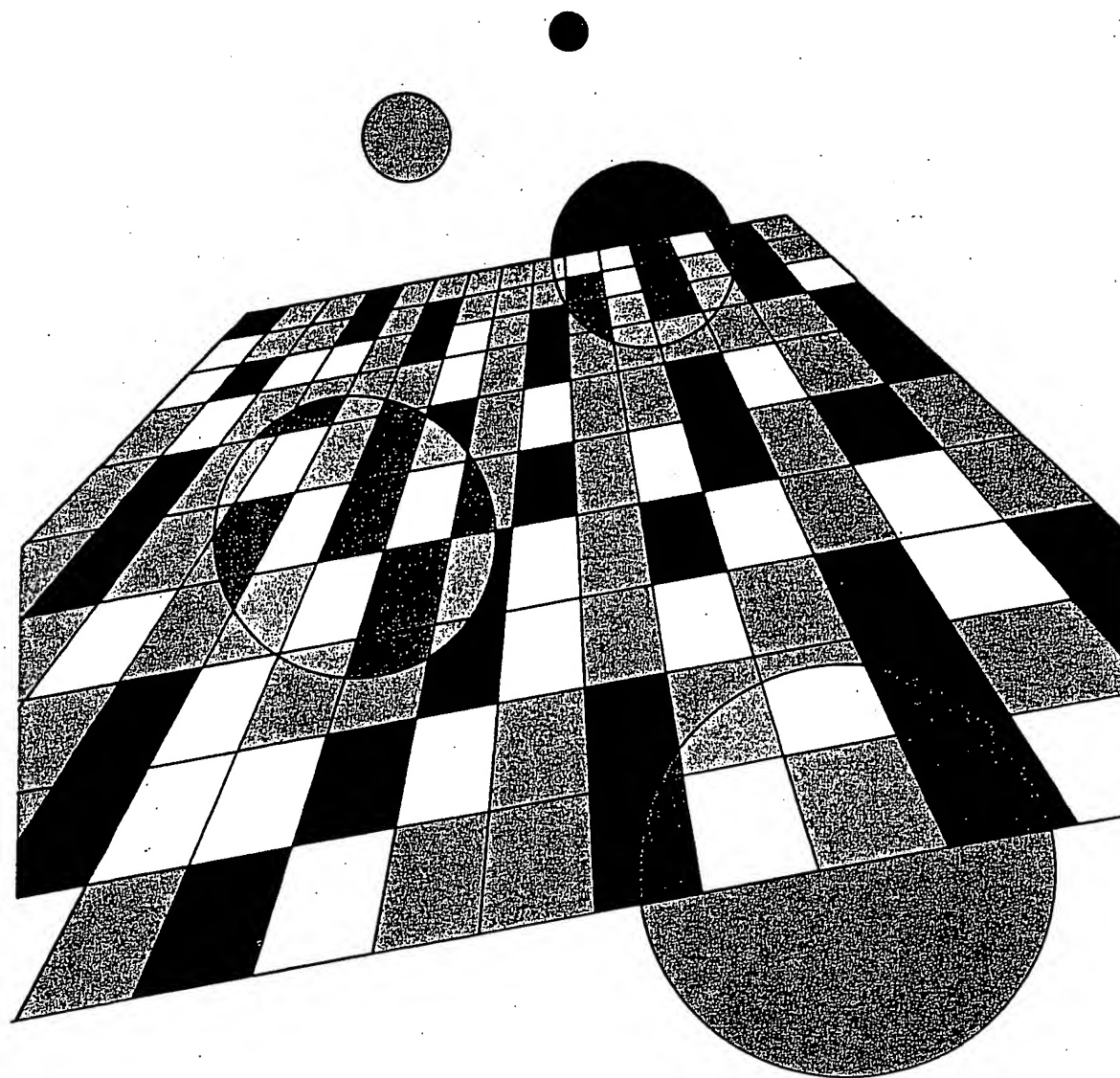
Abstract

It was found that a new metalloprotease, bacillolysin MA which is produced by one strain of *Bacillus megaterium* isolated from soil catalyzes the angiotensin conversion of plasminogen, and the determination of the primary structure of this enzyme, the evaluation of the enzymochemical properties, and the analysis of the angiotensin conversion were carried out. Further, one step process for angiotensin conversion and purification from human plasma using a fixed enzyme was developed.

三島海雲記念財団

研究報告書

平成13年度（第39号）



財団法人 三島海雲記念財団

目 次

財団法人 三島海雲記念財団 設立趣意書	117
---------------------	-----

〔自然科学部門〕

1. 新規摂食促進物質の基礎的、応用的研究：特に家畜の成長促進への効果 宮崎大学農学部獣医学科家畜生理学講座 助教授 村 上 昇	1
2. 細胞内酸化還元状態による遺伝子発現の調節とその栄養制御 名古屋大学大学院生命農学研究科 助教授 小 田 裕 昭	6
3. 糸状菌イヌリン分解酵素の部位特異的変異による機能解析 宮崎大学農学部 助教授 太 田 一 良	11
4. タマネギおよびニンニクに含まれる生理活性物質（有機チオ硫酸化合物）の機能性 北海道大学大学院獣医学研究科 診断治療学講座獣医内科学教室 講 師 大 和 修	14
5. 納豆に含まれるビタミンK結合性ペプチド 京都女子大学家政学部 教 授 土 居 幸 雄	19
6. ビタミンEの脳虚血再灌流障害に対する脳保護効果 筑波大学臨床医学系脳神経外科 講 師 谷 中 清 之	23
7. 過酸化LDLによる血小板活性化機構の解明 北海道大学大学院医学研究科 予防医学講座環境医学分野 講 師 小 田 淳	27
8. ゴマリグナンとトコトリエノールの併用による皮膚過酸化脂質抑制効果に関する研究 椋山女学園大学生活科学部 教 授 山 下 かなへ	29
9. マメ科植物就眠運動をコントロールする化学物質の農業的利用に関する基礎研究 慶応義塾大学理工学部化学科 助教授 上 田 実	33
10. IgA 結合タンパク質 ZG16p の食物アレルギー防御機構に関する研究 お茶の水女子大学理学部化学科 助教授 相 川 京 子	36
11. ビタミンK ₂ （メナキノン-4）の組織内生成機構とその生理的意義の解析 東北大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻栄養学分野 助教授 駒 井 三千夫	39
12. 小児でのカルシウム摂取不足が誘起する筋損傷機序の分子学的研究 名古屋市立大学医学部 助教授 大 羽 利 治	42
13. 辛味受容の分子機構の解明 カプサイシン受容体の発現、構造と機能 三重大学医学部生理学第一講座 教 授 富 永 真 琴	46
14. 死滅細胞内におけるRNAの寿命の解析 横浜国立大学工学部 助 手 鈴 木 市 郎	49

15.	断熱膨張を利用した耐熱性胞子の破壊に関する研究 九州大学大学院農学研究院 食品バイオ工学講座食品製造工学分野 教授 早川 功	54
16.	プラスミノゲンのアンジオスタチン変換を触媒する新規微生物酵素 東京農工大学農学部 助教授 蓮見 恵 司	60
17.	脳におけるDアスパラギン酸の生合成と機能に関する研究 岡山大学薬学部生理化学教室 教授 森山 芳 則	65
18.	ラクトバチルス属乳酸菌の腸管接着メカニズムの解明とその応用に関する研究 京都大学大学院生命科学研究科 教授 山本 憲 二	69
〔人文科学部門〕		
1.	インドネシアにおける豚の禁忌の文化・社会・政治的背景の研究 山口大学教育学部 助教授 中田 考	74
2.	作家郁達夫・日本へかけた青春の夢 弘前学院大学文学部 教授 顧 偉 良	77
3.	地域共有資源管理システムの比較制度分析 帯広畜産大学畜産科学科 講師 耕野 拓 一	82
4.	国際協力における難民支援 －ノン・ルフルマン（追放・送還禁止）原則を手がかりとして－ 名古屋大学大学院博士後期課程 安藤 由香里	86
5.	中国近代における民間慈善団体の活動と家族像の変化に関する研究 鳴門教育大学学校教育学部 助教授 小浜 正 子	90
6.	文字テキストとしての『古事記』 －「古語」と「伝承」の虚構からの脱却－ 東京大学教養学部 教授 神野志 隆 光	93
7.	東アジア諸国の解雇規制と雇用保障制度の比較法的研究 －日本・韓国・中国における市場化と雇用システム－ 九州大学大学院法学研究院 教授 野田 進	96
8.	近代中国東北地域政治の展開におけるモンゴル民族の影響力に関する研究 －満州事変前現地発行新聞記事の分析を中心に－ 県立広島女子大学 助教授 松重 充 浩	102
9.	戦前期南洋群島への建築技術の伝播 －技術移転のあり方を念頭に－ 熊本県立大学環境共生学部 講師 辻原 万規彦	105
10.	ヒヴァ・ハーン国時代のカーディー文書研究 京都外国語大学外国語学部 教授 堀川 徹	109
11.	徳川将軍家発給領知宛行状の基礎的研究 京都大学大学院文学研究科 教授 藤井 讓 治	113

プラスミノーゲンのアンジオスタチン変換を触媒する新規微生物酵素

東京農工大学農学部 助教授 蓮 見 恵 司

緒 言

血管新生は、既存の血管から新しい血管が形成される過程であり、血小板や血管内皮細胞から放出される成長因子等の促進物質と種々の阻害因子により調節される[1]。腫瘍における血管新生はその増殖に必須であり、それゆえ、血管新生抑制剤が新しいガン治療戦略として近年注目されている。その一つであるアンジオスタチンは線溶因子プラスミノーゲンの部分消化断片であり、クリングル領域1-4からなるポリペプチドである[2]。In vivoでのアンジオスタチン産生には、プラスミノーゲン分子内ジスルフィド結合の部分還元、プラスミンによる自己消化、数種のマトリックスプロテアーゼによる限定分解という一連の反応が関与する[3]。アンジオスタチンは血管内皮細胞の増殖、遊走、管空形成を選択的に抑え、アポトーシスを誘導し[4]、これにより血管新生を阻害し、腫瘍の休眠(dormancy)を誘導する[5]。現在、大腸菌により生産される組換え型アンジオスタチンは米国で臨床開発中である。

筆者らは、プラスミノーゲンの活性化を制御する低分子化合物を探索し、いくつかの活性物質を発見してきた。これらはプラスミノーゲンのコンホメーション変化を導き、プラスミノーゲンアクチベーターによる活性化(Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶²間の限定加水分解)を促進する[6-10]。その一方、これらの化合物によるプラスミノーゲンの立体変化は、プラスミンによる自己消化感受性を劇的に増加させ、アンジオスタチン様活性をもつプラスミン派生物の産生を導く。同様の活性をもつ微生物代謝

産物を探索する過程で、有機溶媒処理にも安定なプロテアーゼ(バシロライシンMAと命名)がプラスミノーゲンをアンジオスタチンに変換することを見いだした。本研究では、本酵素の精製、構造決定、酵素化学的性質の評価、アンジオスタチン変換の解析と1段階プロセスによるヒト血漿からのアンジオスタチン変換と精製法の開発を行った。

実験方法

1. バシロライシンMAの生産と精製

東京都国分寺市の土壌から分離した *Bacillus megaterium* A9542 株を、液体培地(1%グルコース1、3%コーンスターチ、1%大豆ミール、0.5%ペプトン、0.5%イーストエキス、0.2% CaCO₃、0.01% CB442(消泡剤)、pH 7.0)で28℃、6日間好気的に培養した。得られた培養液の遠心上清1Lに4Lの水を加え、さらにイソプロピルアルコール(i-PrOH)を終濃度5%添加した。これを、5% i-PrOHを含む20 mM MES-NaOH、pH 6.5で平衡化したCM-celluloseカラム(400 ml)に流速15 ml/minでアプライした。同緩衝液600 mlでカラムを洗浄後0.2 M NaClを含む同緩衝液でバシロライシンMAを溶出し、約90 mgの電気泳動的に均一な精製標品を得た。

2. バシロライシンMAの酵素活性の測定

(1) アミド分解活性: 0.3 mM 3-(2-furylacryloyl)-Gly-Leu amide (FLAGA)の加水分解をTBS/T/Ca(50 mM Tris-HCl、pH 7.4、

0.001% Tween 80, 1 mM CaCl_2 中で 345 nm の吸光変化から測定した。

(2) プラスミノーゲン切断活性: 2 μM プラスミノーゲンと 3.7 nM バシロライシン MA を 37°C で TBS/T/Ca 中 60 min 反応後、反応液の一部を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分画後、染色してバンドをデンストメトリーで定量した。

3. バシロライシン MA 固定化担体

(1) BL-Sepharose: 1 ml の CNBr 活性化 Sepharose 4B に 5 mg のバシロライシン MA をカップリングさせた後に、未反応の活性基をエタノールアミンでブロックした。以下、これを 5BL-Sepharose とした。

(2) BL/Lys-Sepharose: 1 ml の CNBr 活性化 Sepharose 4B に 5, 16, 30mg のバシロライシン MA をカップリングさせた後に、未反応の活性基をリジンでブロックした。以下、これらをそれぞれ 5BL/Lys-Sepharose, 16BL/Lys-Sepharose, 30BL/Lys-Sepharose とした。

4. バシロライシン固定化担体を用いたアンジオスタチン変換

ヒト血漿 9.5 ml に 0.5 ml の i-PrOH を加え、4°C で 30 min 放置後遠心して上清を分離した。これを、5% i-PrOH を含む 50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4 (NaPi/PrOH) で平衡化した 1 ml の固定化担体カラムにアプライし、0.5 M NaCl を含む同緩衝液 20 ml で洗浄した。次いで、3 ml の 0.2 M 6-aminohexanoic acid (6-AHA) を含む NaPi/PrOH で溶出した。溶出画分の一部を濃縮脱塩後、SDS-PAGE で分画染色して、デンストメトリーによりバンドの定量を行った。

実験結果および考察

1. バシロライシン MA の一次構造

精製バシロライシン MA の N 末端アミノ酸配列

を決定した結果、VTGTNAIGSG を得た。データベース検索の結果、本配列は金属プロテアーゼ bacillolysin M の部分配列と一致した。そこで、本菌株のゲノム断片を bacillolysin M の配列に基づいたプライマーを用いた PCR で増幅し、その塩基配列を決定した。その結果、バシロライシン MA の遺伝子配列の 96.9% が bacillolysin M の配列と一致するものの、両者は異なるものであることがわかった。また、塩基配列から予測されるアミノ酸配列は、プロエンザイムで 10 箇所、成熟型で 4 箇所において差が見られた。よって、本酵素をバシロライシン MA (bacillolysin MA) とした。

2. バシロライシン MA の酵素化学的性質

FLAGA の加水分解を指標としたバシロライシン MA の酵素活性 (アミド分解活性) は、至適温度と pH をそれぞれ 60°C、7.5 にもち、0.3 mM CoCl_2 により 2 倍に促進、1 mM ZnCl_2 により 80% 阻害された。バシロライシン MA 活性は、pH 5 あるいは 10 での 37°C、60 min の処理でも 60% 以上の活性を保持したが、pH 4 以下あるいは 12 以上でのインキュベーションで完全に失活した。また pH 6.5 での処理 (20 min) では 60°C までは活性を完全に保持した。

3. バシロライシン MA によるプラスミノーゲンのアンジオスタチン変換

低濃度のバシロライシン MA はプラスミノーゲンの $\text{Ser}^{441}\text{-Val}^{442}$ を選択的に切断し、 $\text{Glu}^{141}\text{-Ser}^{441}$ (アンジオスタチン) と $\text{Val}^{442}\text{-Asn}^{791}$ (ミニプラスミノーゲン) を生成した (図 1, レーン 1)。高濃度では、さらに $\text{Leu}^{74}\text{-Phe}^{75}$ および $\text{Val}^{449}\text{-Leu}^{450}$ の切断が観察された。バシロライシン MA による $\text{Ser}^{441}\text{-Val}^{442}$ 間の開裂の K_m は 18.1 μM 、 k_{cat} は 4.67 sec^{-1} であった。

4. ヒト血漿からのアンジオスタチン変換・精製の 1 段階プロセスの開発

固定化バシロライシン MA 担体を用いて、ヒト血漿中のプラスミノーゲンをアンジオスタチンへ変換し、それを精製するためのプロセスを検討した。種々の担体 (BL-Sepharose) の活性を評価した結果、固定化バシロライシン MA 担体による液相中でのプラスミノーゲン切断活性は、遊離バシロライシン MA の活性の 1/100 以下と極めて効率が悪く、固定化により基質 (プラスミノーゲン) との相互作用が制限されたものと考えられた。そこで、同じ固定化担体上に、プラスミノーゲンと結合するリジンを固定化した担体 (BL/Lys-Sepharose) を作成した。Lys-Sepharose は血漿中のプラスミノーゲンを結合し、リジンアナログである 6-AHA により、選択的にプラスミノーゲンを溶出回収可能である (図 1、レーン 9)。5BL/Lys-Sepharose は血漿中のプラスミノーゲンを結合し、非特異的吸着物質を洗浄後、室温 3 時間のインキュベーションとそれに続く 6-AHA 溶出によりアンジオスタチンへの変換とその精製が同時に達成できた (図 1、レーン 5)。当初、プラスミノーゲン吸着後の室温インキュベーションが必要と考えられたが、予想外なことにこのステップを省略しても、同等のアンジオスタチン変換が可能であった (図 1、レーン 4)。担体 1 ml あたり 16 mg のバシロライシン MA を固定化した担体 (16BL/Lys-Sepharose) では、さらに効率よくアンジオスタチン変換が起こったが (図 1、レーン 6)、室温インキュベーションを加えるとプラスミノーゲン切断が進行し、アンジオスタチンの回収はできなかった (図 1、レーン 7)。また、担体 1 ml あたり 30 mg のバシロライシン MA を固定化した担体 (30BL/Lys-Sepharose) でも、室温インキュベーションをしないにもかかわらずアンジオスタチンの断片化が観察された (図 1、レーン 8)。一方、リジンを結合していないバシロライシン MA 固定化担体 (5BL-Sepharose) ではプラスミノーゲンおよびアンジオスタチンの回収はみられなかった (図 1、レーン 10)。それぞれの担体

表1 固定化バシロライシンMA担体を用いた血漿からのアンジオスタチン変換・精製の定量結果

固定化担体	インキュベーション	ヒト血漿 9.5 ml からの回収量 (μg)	
		アンジオスタチン	プラスミノーゲン
5BL	—	ND	ND
5BL/Lys	—	112	91
5BL/Lys	+	78	78
16BL/Lys	—	139	17
16BL/Lys	+	ND	ND
30BL/Lys	—	132	11
Lys	—	ND	75

ND, 検出不能。

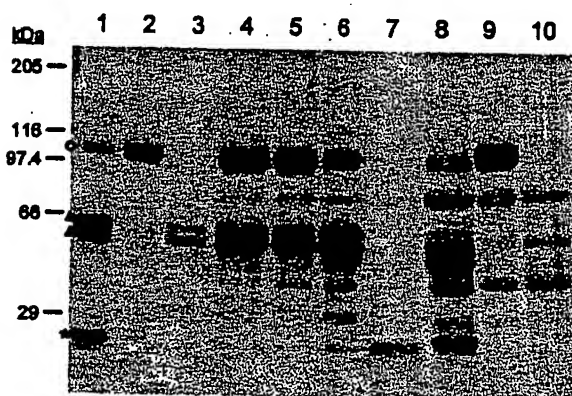


図1 固定化バシロライシン MA 担体を用いた血漿からのアンジオスタチン変換とその精製

レーン 1, プラスミノーゲンのバシロライシン MA 消化物 (○, プラスミノーゲン; △, アンジオスタチン; *, ミニプラスミノーゲン); レーン 2, プラスミノーゲン; レーン 3, 精製アンジオスタチン; レーン 4, 5BL/Lys-Sepharose による精製 (室温インキュベーションなし); レーン 5, 5BL/Lys-Sepharose による精製 (3 時間室温インキュベーション); レーン 6, 16BL/Lys-Sepharose による精製 (室温インキュベーションなし); レーン 7, 16BL/Lys-Sepharose による精製 (3 時間室温インキュベーション); レーン 8, 30BL/Lys-Sepharose による精製 (室温インキュベーションなし); レーン 9, Lys-Sepharose による精製 (室温インキュベーションなし); レーン 10, 5BL-Sepharose による精製 (室温インキュベーションなし)。

を用いた実験の定量結果を表 1 に示す。

以上の結果から、バシロライシン MA とリジンをともに固定化した担体により、プラスミノーゲンの特異的結合とその場でのアンジオスタチン変換を同時に行うことが可能なことが示された。この固定化リアクターの特徴は以下のようにまとめることができる。(1) 固定化リアクターがアフィニティー担体の性質を持つため、血漿という非常に多くの夾雑物質を含む原料から特異的にプラスミノーゲンをリアクターに補足できる。(2) バシロラ

イシンMAのみの固定化リアクターによるアンジオスタチン変換効率はきわめて低い、プラスミノーゲンを結合するリジンとともに固定化したリアクターでは、触媒の近傍に基質を補足して速やかな反応を可能とする。(3)補足した基質から生成する2種の産物(アンジオスタチンとミニプラスミノーゲン)のうち、必要とする産物(アンジオスタチン)が固定化リアクターとの結合性を保つのにに対し、不要な産物が結合性を失うため、目的物質の1段階精製が可能である。以上のようなこれまでに例のない特性をもつリアクターは、簡便な操作で、血漿から大量のアンジオスタチン変換・精製をする途を拓くものであり、その利用により、現在利用されている組換えアンジオスタチンの問題点(溶解性および糖鎖がないことによる生物活性の差)を克服することが期待される。

要 約

土壌から分離した *Bacillus megaterium* の1株が生産する新規金属プロテアーゼバシロライシンMAがプラスミノーゲンのアンジオスタチン変換を触媒することを発見し、本酵素の一次構造決定、酵素化学的性質の評価、アンジオスタチン変換の解析を行った。さらに、固定化酵素を用いたヒト血漿からのアンジオスタチン変換・精製の1段階プロセスを開発した。

謝 辞

本研究の一部は三島海雲記念財団からの学術奨励金により遂行されたものであり、ここに記して感謝の意を表します。実験に協力していただいた奈良崎律子氏、栗林春茂氏、清水幸輔氏に感謝します。

文 献

1. Browder, T., Folkman, J. & Pirie-Shepherd, S. (2000) The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 275, 1521-1524.

2. O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H. & Folkman, J. (1994) Angiostatin : a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-328.
3. Lay, A. J., Jiang, X.-M., Kisker, O., Flynn, E., Underwood, A., Condrón, R. & Hogg, P. J. (2000) Phosphoglycerate kinase acts in tumor angiogenesis as a disulphide reductase. *Nature* 408, 869-873.
4. Claesson-Welsh, L., Welsh, M., Ito, N., Ansén-Apte, B., Soker, S., Zetter, B., O'Reilly, M. & Folkman, J. (1998) Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5579-5584.
5. O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Chen, C. & Folkman, J. (1996) Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat. Med.* 2, 689-692.
6. Takayasu, R., Hasumi, K., Shinohara, C. & Endo, A. (1997) Enhancement of fibrin binding and activation of plasminogen. *FEBS Lett.* 418, 58-62.
7. Hasumi, K., Ohshima, S., Kohyama, T., Ohsaki, Y., Takayasu, R. & Endo, A. (1998) Isolation of SMTP-3, 4, 5 and -6, novel analogs of Staphin, and their effects on plasminogen activation and fibrinolysis. *J. Antibiotics* 51, 1059-1068.
8. Ohshima, S., Wada, Y. & Hasumi, K. (2002) Antibiotic A10255 (thioplabin) enhances fibrin binding and activation of plasminogen. *J. Antibiotics* 55, 83-91.
9. Kikuchi, T. & Hasumi, K. (2002) Enhancement of plasminogen activation by

surfactant C : augmentation of fibrinolysis in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1596, 234-245.

10. 蓮見恵司、菊池唯史 (2001) 線溶を促進する微生物由来低分子化合物. *日本血栓止血学会誌* 12, 314-319.

脳におけるDアスパラギン酸の生合成と機能に関する研究

岡山大学薬学部生理化学教室 教授 森 山 芳 則

1. はじめに

D体アミノ酸が哺乳類で見出されたのは最近である。中でもDセリンとDアスパラギン酸は脳や内分泌器官に高濃度存在しており、神経内分泌機能と関係があると考えられる。DセリンはNMDA受容体の調節因子であり、アストログリアで生合成・分泌される。一方、Dアスパラギン酸の生理的意義と並びに分子レベルでの作動機構はほとんど明らかになっていない。本研究は脳神経・内分泌系におけるDアスパラギン酸の生合成と生理的意義を明らかにすることを目的とした。この小文において、我々がこれまでに得た結果について概説し報告書に代えたい。

2. 研究の端緒

私はこれまでD体のアミノ酸の生化学・生物学には全く無知であった。ここ数年、内分泌細胞における種々の分泌現象に興味を持ち、主に松果体という内分泌器官を用いて研究を行ってきた。松果体を用いたことが当該研究の端緒となった。本論に入る前にこれまでの経過を簡単に記す。

松果体は間脳の一部がくびれてできた嚢状の内分泌器官であり、概日リズム・ホルモンとして知られるメラトニンを合成・分泌している。松果体はメラトニンを合成する松果体実質細胞と数種類のグリア様細胞、多数の投射する神経末端、内分泌器官に特有の血管網からできている。この松果体実質細胞はその一部を血管に向け分布しているが、近接する細胞とも触手状の構造体（プロセス）で接している。このプロセス部にグルタミン酸を

含む多数の分泌小胞（シナプス小胞様マイクロベジクル、synaptic-like microvesicles, SLMVs）が存在していることを見出した。単離したマイクロベジクルにATPを添加すると、グルタミン酸が能動輸送された。さらに、マイクロベジクルに蓄積されたグルタミン酸は、細胞を刺激することで細胞外に放出された。これは神経以外でグルタミン酸が開口放出された最初の例であった。さらに詳細に調べてみると、マイクロベジクルにはLアスパラギン酸も含まれており、グルタミン酸と一緒に細胞外へ放出されることがわかった。

興奮性アミノ酸が情報伝達物質として機能するためには、少なくとも3つの装置が必要であろう。すなわち、(1) 小胞内へ興奮性アミノ酸を蓄積し細胞外へ放出するための出力系、(2) シグナルを終止するための終止系、そして(3) 放出されたシグナルを受容するための入力系である。これらはグルタミン酸作動系と総称される（図1）。松果

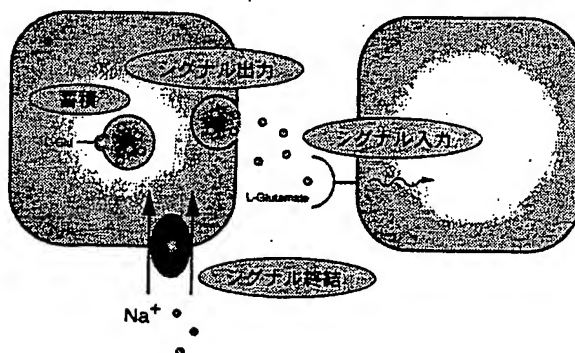


図1 グルタミン酸作動系の各要素

体における興奮性アミノ酸の開口放出が生理的に意味があるのならば、(2)や(3)に相当する装

三島海雲記念財団

研究報告書

平成13年度（第39号）

発行日 平成14年12月1日

発行所 財団法人 三島海雲記念財団
〒150-0021 東京都渋谷区恵比寿西2-20-3
カルピス株式会社ビル内
電話 03-3780-2317

印刷所 総研軽印刷有限公司